

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-152276

(43)Date of publication of application : 08.06.1999

(51)Int.Cl.

C07D243/24
C07D243/14
// A61K 31/55
A61K 31/55
C07D403/06

(21)Application number : 09-336444

(71)Applicant : HOKURIKU SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 20.11.1997

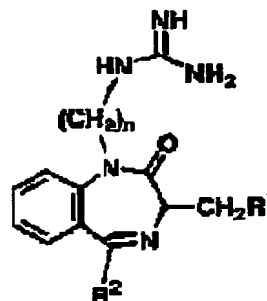
(72)Inventor : WATANABE YOSHINARI
KIMURA TATSUYA
KABUKI HIROSHI
IWASAKI NOBUHIKO
IKEDA YOSHITAKA

(54) BENZODIAZEPINE DERIVATIVE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a medicine having excellent affinity for thrombopoietin receptor and agonist activity on the receptor and having platelet production regulating action.

SOLUTION: This benzodiazepine derivative represented by the formula [R1 is phenyl group which may have a substituent group or 1H-indolyl group which may have a substituent group; R2 is a phenyl group which may have a substituent group or a lower alkyl group; (n) represents an integer of 1-4] or its pharmacologically acceptable salt has excellent affinity for thrombopoietin receptor and agonist activity on the receptor and is extremely useful as a medicine having platelet regulating action.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-152276

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月8日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	F I	
C 0 7 D 243/24	5 1 1	C 0 7 D 243/24	5 1 1
243/14		243/14	
// A 6 1 K 31/55	A C B	A 6 1 K 31/55	A C B
	A E D		A E D
C 0 7 D 403/06	2 0 9	C 0 7 D 403/06	2 0 9
		審査請求 未請求 請求項の数 1	F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平9-336444

(22) 出願日 平成9年(1997)11月20日

(71) 出願人 000242622

北陸製薬株式会社

福井県勝山市猪野口37号1番地1

(72) 発明者 渡辺 良成

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72) 発明者 木村 達也

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72) 発明者 蕪城 博

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

最終頁に続く

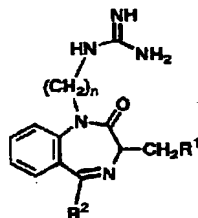
(54) 【発明の名称】 ベンゾジアゼピン誘導体

(57) 【要約】

【課題】 トロンボポエチンレセプターへの優れた親和性と該レセプターに対するアゴニスト活性を有し、血小板産生調節作用を持つ薬剤を提供する。

【解決手段】 次の一般式

【化1】



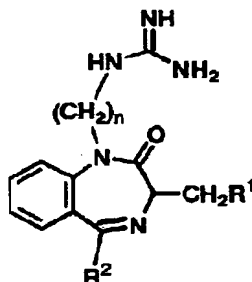
(式中、R¹ は置換基を有してもよいフェニル基又は置換基を有してもよい1H-インドリル基を表し、R² は置換基を有してもよいフェニル基又は低級アルキル基を表し、nは1~4の整数を表す。)で示されるベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩は、トロンボポエチンレセプターへの優れた親和性と該レセプターに対するアゴニスト活性を有し、血小板産生調節作

用を持つ薬剤として極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次の一般式

【化1】



(式中、R¹は置換基を有してもよいフェニル基又は置換基を有してもよい1H-インドリル基を表し、R²は置換基を有してもよいフェニル基又は低級アルキル基を表し、nは1～4の整数を表す。)で示されるベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、巨核球造血、血小板産生に深く関わるトロンボポエチンレセプターに対する親和性及びアゴニスト活性を有し、血小板産生調節作用を持つ新規なベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩に関するものである。

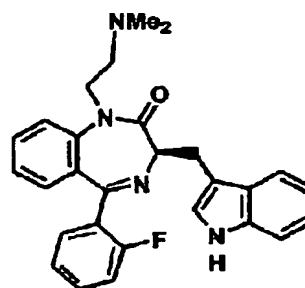
【 0 0 0 2 】

【従来の技術】血小板は生体の止血、血栓形成において主要な役割を果たす血液有形成分である。血小板は骨髓幹細胞から巨核球前駆細胞より骨髓で分化、成熟して生じた巨核球より血中に放出されるが、その寿命は約10日であり、その数は長期にわたって一定の値を保つことが知られていた。この巨核球造血の過程における主要な因子であるトロンボポエチンの遺伝子が最近クローニングされ〔ネイチャー(Nature), 369 巻, 533 頁(1994年)〕、トロンボポエチンはc-mpl がコードしているタンパク質(トロンボポエチンレセプター: MPL)のリガンドであり、巨核球前駆細胞から巨核球細胞の増殖と分化成熟を刺激し、さらに血小板産生を増加させることも判明した〔Nature, 369 巻, 568 頁(1994年)〕。また、トロンボポエチンがそのレセプターに結合すると、細胞内シグナル伝達因子であるSTAT5 が活性化されることも判明し〔ブラッド(Blood), 89巻, 483 頁(1997年)〕、このSTAT5 は巨核球の分化に必要な遺伝子の発現を誘導すると推測されている。

【0003】現在まで、トロンボエチンレセプターを介して血小板産生を調節する生理活性物質としては、トロンボエチンそのものの他、W096/40189号及びW096/40750号明細書に開示されている低分子ペプチドなども知られている。

【0004】又、本発明に係るベンゾジアゼピン誘導体と類似構造を有する化合物としては、次式

【化2】



10

で示される(R)-1-(2-ジメチルアミノエチル)-5-(2-フルオロフェニル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オンが知られており、特開昭61-063666号、特開昭63-238069号及びジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(Journal of Medicinal Chemistry), 30巻, 1229頁(1987年)等においてCCK拮抗剤として開示され、またWO95/14470号ではカリウムイオン遮断による不整脈治療剤として開示されているが、これら文献には本発明に係るトロンボポエチンレセプター親和性及びアブニスト活性について全く触れられていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前述のトロンボエチンや低分子ペプチドなどの生理活性物質は、トロンボエチンレセプターを介して血小板産生を調節し、血小板数の減少を伴う種々の血液疾患の病態に対して優れた薬剤として期待されている。しかしながら、トロンボエチンは332個のアミノ酸からなるポリペプチドサイトカインであり、薬剤として用いる場合、消化管内で分解されると予測され、注射剤としては利用できるが、経口投与製剤としては実用的ではないと考えられる。また、トロンボエチン様作用を有する低分子ペプチドも、経口投与の可能性が未知数であることなどから、優れたトロンボエチンレセプター親和性及びアゴニスト活性を有し経口投与可能な低分子非ペプチド化合物の開発が望まれている。

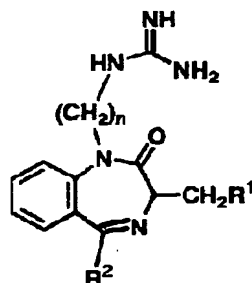
【０００６】本発明の課題は、優れたトロンボポエチンレセプター親和性及びアゴニスト活性を有し、且つ経口投与可能な低分子非ペプチド化合物を見出し、血小板数の減少を伴う種々の病態に対し優れた効果が期待できる治療薬を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明に係る新規なベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩が、優れたトロンボエチンレセプター親和性及びアゴニスト活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

50 【0008】即ち、本発明は次の一般式（I）

【化3】



(I)

(式中、 R^1 は置換基を有してもよいフェニル基又は置換基を有してもよい1H-インドリル基を表し、 R^2 は置換基を有してもよいフェニル基又は低級アルキル基を表し、 n は1~4の整数を表す。)で示される新規なベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の前記一般式(I)において、 R^1 で示されるフェニル基又は1H-インドリル基及び R^2 で示されるフェニル基は、適宜置換基を有していてもよく、置換基としては、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基等の低級アルキル基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子等のハロゲン原子、水酸基、シアノ基、ニトロ基等が挙げられる。 R^2 で示される低級アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 $tert$ -ブチル基、 n -ペンチル基、 n -ヘキシル基等が挙げられる。

【0010】本発明の前記一般式(I)で示される化合物には、不斉に基づく異性体が存在するが、これらの異性体及びその混合物も本発明の範囲に包含される。

【0011】本発明の前記一般式(I)で示される化合物又はその薬理学的に許容しうる塩は、製造条件により任意の結晶形として存在することができ、任意の水和物として存在することもできるが、これらの結晶形や水和物及びその混合物も本発明の範囲に包含される。又、アセトン、エタノール、テトラヒドロフラン等の有機溶媒を含む溶媒和物として存在することもあるが、これらの形態の物質はいずれも本発明の範囲に包含される。

【0012】本発明の前記一般式(I)で示される化合物は、所望に応じて薬理学的に許容しうる塩に変換することも、又は生成した塩から遊離塩基に変換することもできる。本発明の薬理学的に許容しうる塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、磷酸等の鉱酸塩、あるいは、酢酸、マレイン酸、フマル酸、クエン酸、シュウ酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、 p -トルエンスルホン酸、10-カンファースルホン酸等の有機酸塩等が挙げられる。

【0013】本発明に係るベンゾジアゼピン誘導体の好

ましい態様としては、以下の化合物及びその薬理学的に許容しうる塩を挙げることができるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

(1) (±)-1-(グアニジノメチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(2) (±)-1-(2-グアニジノエチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(3) (±)-1-(3-グアニジノプロピル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(4) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(5) (R)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(6) (S)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(7) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(8) (±)-5-(2-フルオロフェニル)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(9) (±)-1-(グアニジノメチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(10) (±)-1-(2-グアニジノエチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(11) (±)-1-(3-グアニジノプロピル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン

-2-オン

(12) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(13) (R)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(14) (S)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(15) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(5-メチル-1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(16) (±)-5-(2-フルオロフェニル)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(17) (±)-1-(グアニジノメチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(18) (±)-1-(2-グアニジノエチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(19) (±)-1-(3-グアニジノプロピル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(20) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

【0014】(21) (R)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(22) (S)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(23) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(4-ヒドロキシフェニルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オ

ン

(24) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-イソプロピル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(25) (±)-1-(グアニジノメチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(26) (±)-1-(2-グアニジノエチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(27) (±)-1-(3-グアニジノプロピル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(28) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(29) (R)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(30) (S)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

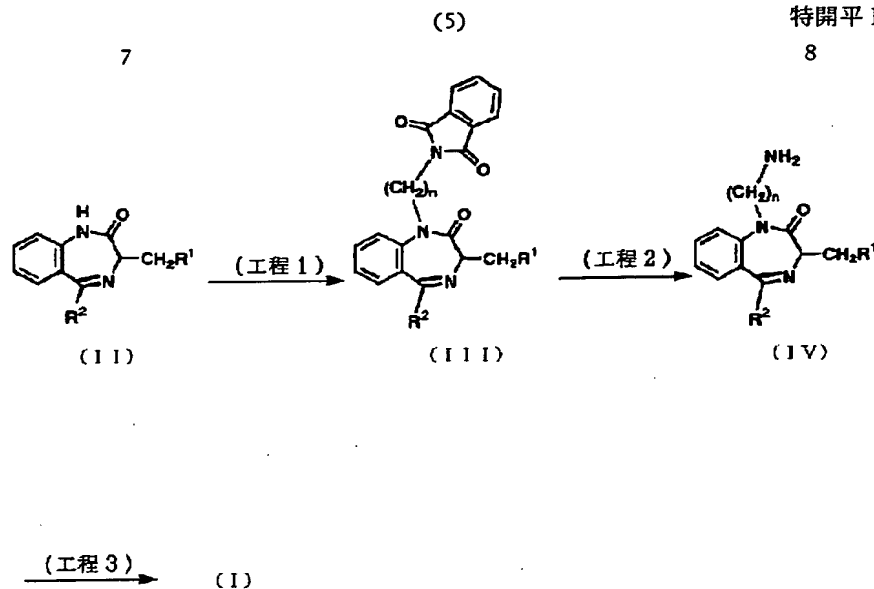
(31) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(5-メチル-1H-インドール-3-イルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(32) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-イソプロピル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

【0015】本発明の前記一般式(I)で示される化合物は、以下の方法により製造することができるが、当該化合物の製造方法は、この方法に限定されるわけではない。

【0016】

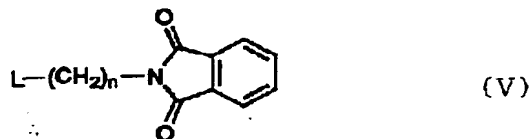
【化4】



(式中、 R^1 、 R^2 及び n は前述と同意義を表す。)

【0017】即ち、工程1においては、特開昭61-63666号、特開昭63-238069号及びJournal of Medicinal Chemistry、30巻、1229頁(1987年)等に開示されている一般式(II)の化合物と、次の一般式(V)・

【化5】



(Lは塩素原子、臭素原子等のハロゲン原子又はメシロオキシ基等の脱離基を表し、 n は前述と同意義を表す。)で示される化合物を、N、N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の溶媒中、水素化ナトリウム、リチウムジイソプロピルアミド等の塩基の存在下で、 0°C から溶媒の還流温度までの範囲で反応させることにより、一般式(III)の化合物を得ることができる。

【0018】工程2においては、一般式(III)の化合物をエタノール等の溶媒中、抱水ヒドラジン又はメチルアミンと 0°C から溶媒の還流温度までの範囲で反応させることにより、一般式(IV)の化合物を得ることができる。

【0019】工程3においては、一般式(IV)の化合物と1H-ピラゾール-1-カルボキサジン等のグアニル化試薬とをN、N-ジメチルホルムアミド等の溶媒中、 0°C から溶媒の還流温度までの範囲で反応させることにより、本発明に係る前記一般式(I)の化合物を得ることができる。

【0020】このようにして製造される前記一般式(I)で示される新規なベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩の少なくとも1つを有効成分として含有する医薬は、通常、カプセル剤、錠剤、細粒

剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口剤、あるいは注射剤として投与される。これらの製剤は、薬理学的、製剤学的に許容しうる添加剤を加え、常法により製造することができる。即ち経口剤にあっては、賦形剤(乳糖、D-マンニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等)、崩壊剤(カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等)、結合剤(ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム、タルク等)、コーティング剤(ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、酸化チタン等)、可塑剤(ポリエチレングリコール等)等の製剤用成分が、注射剤にあっては水性あるいは用時溶解型剤型を構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤(注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等)、pH調節剤(無機又は有機の酸あるいは塩基)、等張化剤(食塩、ブドウ糖、グリセリン等)、安定化剤等の製剤成分が使用される。

【0021】本発明化合物の治療患者への投与量は、患者の症状、年齢等により異なるが、通常成人の場合、経口投与で1~2000mg、非経口投与で1~200mgを、1日1回又は数回に分けて投与することができる。

【0022】

【実施例】以下、本発明を例によって説明するが、本発明はこれらの例の特定の細部に限定されるものではない。

【0023】例1

(±)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

a) (±)-N-[4-{2,3-ジヒドロ-2-オキソ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド

(±)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 4.00 g (12 mmol) 及び N, N-ジメチルホルムアミド 50 ml の混合物に、氷冷下 60% 水素化ナトリウム 0.54 g (14 mmol) を加えた。氷冷下 1.5 時間攪拌後、N-(4-プロモブチル)フタルイミド 7.00 g (25 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応混合物に水 100 ml を加え、溶媒を吸引濾去した。残渣を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサ

ン:酢酸エチル=2:1)により精製し、黄色無晶形固体を得た。得られた固体にジイソプロピルエーテルを加えて結晶化させ、吸引濾過して、融点 124~126°C の微黄色結晶 5.90 g (収率 91%) を得た。

元素分析値 $C_{23}H_{23}N_3O_3$

理論値 C, 77.40; H, 5.54; N, 7.96

実験値 C, 77.08; H, 5.52; N, 7.94

b) (±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[4-{2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド 4.00 g (7.6 mmol), 抱水ヒドラジン 0.41 ml (8.5 mmol) 及びエタノール 40 ml の混合物を 4 時間加熱還流した。放冷後、反応混合物に 5% 水酸化ナトリウム水溶液 100 ml を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール=5:1)により精製し、微黄色無晶形固体 1.17 g (収率 39%) を得た。

IR スペクトル ν (liq) cm^{-1} : 3376, 1676, 1606

NMR スペクトル δ ($CDCl_3$) ppm : 1.21-1.35(2H, m), 1.40-1.60(4H, m), 2.48-2.57(2H, m), 3.59(2H, d, J=6.5 Hz), 3.65(1H, ddd, J=13.5, 7.5, 5.5 Hz), 3.78(1H, t, J=6.5 Hz), 4.43(1H, dt, J=14, 7.5 Hz), 7.15-7.56(14H, m)

高分解能マスペクトル: $C_{26}H_{27}N_3O$

理論値 m/z : 397.2154

実験値 m/z : 397.2150

c) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

(±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 1.50 g (3.8 mmol) を、1H-ピラゾール-1-カルボキサミジン・塩酸塩 0.55 g (3.8 mmol), N, N-ジイソプロピ

ルエチルアミン 0.49 g (3.8 mmol) 及び N, N-ジメチルホルムアミド 6 ml の混合物に加えた。室温で 4 時間攪拌後、反応混合物にジエチルエーテル 50 ml を加え、吸引濾過した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール=5:1)により精製し、微黄色無晶形固体 1.27 g (収率 68%) を得た。

元素分析値 $C_{27}H_{29}N_5O \cdot HCl \cdot 5/4 H_2O$

理論値 C, 65.05; H, 6.57; N, 14.05

実験値 C, 65.04; H, 6.61; N, 14.10

[0024] 例 2

(±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

a) (±)-N-[4-{2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド

(±)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 1.50 g (4.1 mmol) 及び N, N-ジメチルホルムアミド 30 ml の混合物に、氷冷下 60% 水素化ナトリウム 0.17 g (4.3 mmol) を加えた。氷冷下 1 時間攪拌後、N-(4-プロモブチル)フタルイミド 2.48 g (8.8 mmol) を加え、室温で 16 時間攪拌した。反応混合物に水 100 ml を加え、溶媒を吸引濾去した。残渣を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール=5:1)により精製し、黄色無晶形固体 2.13 g (収率 92%) を得た。

元素分析値 $C_{30}H_{29}N_3O_3$

理論値 C, 76.31; H, 5.34; N, 9.89

実験値 C, 76.18; H, 5.16; N, 9.85

b) (±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[4-{2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド 1.50 g (2.7 mmol), 抱水ヒドラジン 0.14 ml (2.9 mmol) 及びエタノール 20 ml の混合物を 5 時間加熱還流した。放冷後、反応混合物に 5% 水酸化ナトリウム水溶液 50 ml を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(アルミナ、ジクロロメタ

ン：メタノール=20：1→9：1）により精製し、微褐色無晶形固体0.81g（収率70％）を得た。

IRスペクトル ν (KBr) cm^{-1} : 3360, 1672, 1602

NMRスペクトル δ (CDCl_3) ppm : 1.22-1.57(6H, m), 2.53(2H, dd, $J=13.5, 6.5\text{Hz}$), 3.63-3.71(2H, m), 3.78-3.84(2H, m), 4.44(1H, dt, $J=14, 7\text{Hz}$), 7.05-7.65(14H, m), 8.01(1H, brs)

高分解能マスペクトル: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$

理論値 m/z : 436.2263

実験値 m/z : 436.2263

c) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

(±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 0.81g (1.9mmol) を、1H-ピラゾール-1-カルボキサミジン・塩酸塩 0.27g (1.9mmol), N, N-ジイソプロピルエチルアミン 0.24g (1.9mmol) 及び N, N-ジメチルホルムアミド 1.8ml の混合物に加えた。室温で2.5時間攪拌後、反応混合物にジエチルエーテル20mlを加え、吸引濾過した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン：メタノール=5：1）により精製し、淡黄色無晶形固体0.55g（収率56％）を得た。

元素分析値 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$

理論値 C, 66.46; H, 6.15; N, 16.04

実験値 C, 66.12; H, 6.28; N, 15.68

【0025】例3

(±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

a) (±)-N-[4-{2, 3-ジヒドロ-5-メチル-2-オキソ-3-(フェニルメチル)-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド

(±)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 2.65g (10mmol) 及び N, N-ジメチルホルムアミド 50ml の混合物に、氷冷下 60% 水素化ナトリウム 0.42g (11mmol) を加えた。氷冷下 1 時間攪拌後、N-(4-プロモブチル)フタルイミド 7.00g (25mmol) を加え、室温で 4 時間攪拌した。反応混合物に水 150ml を加え、溶媒を吸引濾去した。残渣を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ヘキサン：酢酸エチル=2：1）により精製し、無色無晶形固体を得た。

得られた固体にジイソプロピルエーテルを加えて結晶化させ、吸引濾過して、融点 137~139.5℃ の無色結晶 3.75g（収率 81％）を得た。

元素分析値 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$

理論値 C, 74.82; H, 5.85; N, 9.03

実験値 C, 75.06; H, 6.06; N, 9.07

b) (±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

10 (±)-N-[4-{2, 3-ジヒドロ-5-メチル-2-オキソ-3-(フェニルメチル)-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド 3.65g (7.8mmol), 抱水ヒドラジン 0.42ml (8.7mmol) 及びエタノール 50ml の混合物を 3.5 時間加熱還流した。放冷後、反応混合物に 5% 水酸化ナトリウム水溶液 100ml を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン：メタノール=5：1）により精製し、褐色油状物質 2.00g（収率 76％）を得た。

IRスペクトル ν (liq) cm^{-1} : 3368, 1674, 1628

NMRスペクトル δ (CDCl_3) ppm : 1.24-1.60(4H, m), 1.63(2H, brs), 2.46(3H, s), 2.61(2H, t, $J=7.5\text{Hz}$), 3.30-3.35(1H, m), 3.59-3.66(3H, m), 4.27(1H, dt, $J=14, 7\text{Hz}$), 7.13-7.51(9H, m)

高分解能マスペクトル: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$

理論値 m/z : 335.1998

30 実験値 m/z : 335.1991

c) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩 (±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 1.50g (4.5mmol) を、1H-ピラゾール-1-カルボキサミジン・塩酸塩 0.66g (4.5mmol), N, N-ジイソプロピルエチルアミン 0.78ml (4.5mmol) 及び N, N-ジメチルホルムアミド 4.5ml の混合物に加えた。室温で 4 時間攪拌後、反応混合物にジエチルエーテル 45ml を加え、吸引濾過した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン：メタノール=5：1）により精製し、淡褐色無晶形固体 0.87g（収率 45％）を得た。

元素分析値 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$

理論値 C, 61.17; H, 7.00; N, 16.21

実験値 C, 61.00; H, 7.02; N, 16.13

【0026】例4

50 (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1, 3-ジヒ

ドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

a) (±)-N-[4-{2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2-オキソ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン 3.00 g (9.9 mmol) 及び N,N-ジメチルホルムアミド 30 ml の混合物に、氷冷下 60% 水素化ナトリウム 0.42 g (11 mmol) を加えた。氷冷下 1.5 時間攪拌後、N-(4-ブロモブチル)フタルイミド 7.00 g (25 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応混合物に水 150 ml を加え、溶媒を吸引濾去した。残渣を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン→ジクロロメタン：メタノール=20:1）により精製し、黄色無晶形固体を得た。得られた固体にジイソプロピルエーテルを加えて結晶化させ、吸引濾過して、融点 171.5~173.5℃ の無色結晶 3.30 g (収率 66%) を得た。

元素分析値 $C_{21}H_{28}N_4O_2$

理論値 C, 73.79; H, 5.59; N, 11.10

実験値 C, 73.76; H, 5.66; N, 11.03

b) (±)-1-(4-アミノブチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (±)-N-[4-{2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2-オキソ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド 3.30 g (6.5 mmol)、抱水ヒドラジン 0.35 ml (7.2 mmol) 及びエタノール 40 ml の混合物を 5 時間加熱還流した。放冷後、反応混合物に 5% 水酸化ナトリウム水溶液 100 ml を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣 2.70 g のうち 1.20 g をカラムクロマトグラフィー（アルミナ、ジクロロメタン：メタノール=10:1）により精製し、無色無晶形固体 0.45 g (収率 18%) を得た。

IR スペクトル ν (liq) cm^{-1} : 3304, 1668, 1626

NMR スペクトル δ ($CDCl_3$) ppm : 1.25-1.60(6H, m), 2.47(3H, s), 2.62(2H, t, J=7Hz), 3.44(1H, dd, J=14.5, 6 Hz), 3.60-3.67(2H, m), 3.78-3.83(1H, m), 4.23-4.29(1H, m), 7.00-7.56(9H, m), 8.07(1H, brs) 高分解能マススペクトル : $C_{21}H_{28}N_4O$

理論値 m/z : 374.2107

実験値 m/z : 374.2104

c) (±)-1-(4-グアニジノブチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン・塩酸塩

(±)-1-(4-アミノブチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン 1.50 g (4.0 mmol) を、1H-ピラゾール-1-カルボキサミジン・塩酸塩 0.59 g (4.0 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン 0.70 ml (4.0 mmol) 及び N,N-ジメチルホルムアミド 4 ml の混合物に加えた。室温で 15 時間攪拌後、反応混合物にジエチルエーテル 40 ml を加え、吸引濾過した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン：メタノール=5:1）により精製し、淡黄色無晶形固体 0.50 g (収率 25%) を得た。

元素分析値 $C_{24}H_{30}N_6O \cdot HCl \cdot 9/4 H_2O$

理論値 C, 58.41; H, 6.84; N, 17.03

実験値 C, 58.14; H, 6.51; N, 16.85

【0027】以下、本発明化合物のトロンボボエチンレセプター結合親和性を評価するために、トロンボボエチンと被験化合物とのトロンボボエチンレセプターに対する競合実験を行った。又、本発明化合物のトロンボボエチンレセプターに対するアゴニスト活性を確認するために、トロンボボエチンレセプターを介した細胞内シグナル伝達因子である STAT5 の活性化をゲルシフトアッセイ法を用い評価した。

【0028】試験例 1

30 ヒトトロンボボエチンレセプター (MPL) 発現プラスミドの構築

(1) まず、ブラックハイブリダイゼーション法により、MPL cDNA の全領域を保持するファージクローンを得た。このために PCR 法によりヒト胎児肝 cDNA (CLONTECH 社製) からヒト MPL cDNA の一部を取得した。なお、MPL cDNA の開始コドンから終止コドンは GenBank M90102 に、開始コドンの上流の配列は EMBL X73551 に登録されている。PCR のためのプライマーは、MPL の開始コドンの A から数えて 331 塩基目から 350 塩基目の配列に基づいたセンスプライマー 5'-GTGCGTCTCTTCTTCCGCT-3' と、1888 塩基目から 1907 塩基目の配列に基づいたアンチセンスプライマー 5'-TCAACGCTGCTGCCAATAGC-3' を用いた。PCR は、Takara EX Taq (宝酒造社製) により添付の反応バッファーを用い通常の条件で行った。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、ゲルから SUPREC-01 (宝酒造社製) を用いて、添付のプロトコールに従い回収した。回収した PCR 産物を、Rediprime DNA labelling system (Amersham 社製) を用いて、添付のプロトコールに従い [α - ^{32}P] dCTP でラベルし、プローブとした。これを

50 用いて、Human Fetal Liver 5'-STRETCH cDNA library

(CLONTECH社製)から、添付のプロトコールに従い、MPL cDNAのコーディング全領域と少なくとも開始コドンより上流60塩基以上を保持するファージクローンを単離し、常法に従ってファージを調製した。

(2) 次に PCR法により、ヒトMPL 細胞外領域cDNA (1 から 491番目のアミノ酸配列)をコードする DNAを取得した。PCRのための鋳型は上記で得られたファージを用い、プライマーは MPLの開始コドンの28塩基上流から17塩基分の配列に基づいたセンスプライマー5'-CTAAGCCAGCCACACAG-3' と、486 から 491番目のアミノ酸配列に基づいたアンチセンスプライマー5'-GGTGACCCAGCGGTCTCGGTGGC-3'を用いた。この際、MPL細胞外領域タンパク質のC末端領域がヒトIgG Fcと連結できるようにBstEIIサイトをに入れ、さらに読み枠が一致するようにした。また、ヒトIgG Fc領域cDNAは、B. D. Bennett らの文献〔ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry), 266巻, 23060 頁 (1991年)〕を参考にして、センスプライマー5'-CGCCGTCACCCGACAAACTCA-3' とアンチセンスプライマー5'-GCATCTCATTTACCCGAGACAGGGAGA-3'を用いて、ヒト脾臓のQUICK-CLONE cDNA (CLONTECH社製)を材料として、PCR法により取得した。このようにして得られた PCR産物を、以下に述べる工程に従ってpCR3 (Invitrogen社製)に組み込み、MPL発現プラスミドを構築した。

(3) PCRで得られた MPL細胞外領域cDNAとヒトIgG Fc領域cDNAを、EUKARYOTIC TA CLONING KIT (Invitrogen社製)を用いて添付のプロトコールに従い、pCR3哺乳細胞発現ベクターに挿入した後、大腸菌TOP10 に形質転換した。得られた形質転換体を常法に従い大量培養した。これから常法に従いプラスミドを調製し、それぞれMPL(B)-pCR3、IgG Fc(B)-pCR3と命名した。

(4) 約 200μg のMPL(B)-pCR3 を、0.64 unitsのBstEII (東洋紡社製)と 200 unitsのScaI (宝酒造社製)で切断後、これをアガロース電気泳動に供した。該プラスミドより、MPL cDNA領域を含む3085塩基対の DNA断片を含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から常法により DNAを抽出した。

(5) 約20μg のIgG Fc(B)-pCR3を、40 unitsのBstEII (東洋紡社製)と 80 unitsのScaI (宝酒造社製)で切断後、アルカリフォスファターゼ (東洋紡社製)にて脱リン酸化後、これをアガロース電気泳動に供した。該プラスミドより、IgG Fc領域cDNAを含む4150塩基対の DNA断片を含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から DNAを抽出した。

(6) (4) で得た DNA断片 (約30 ng)と(5) で得た DNA断片 (約20 ng)を、4.6 units のT4 DNAライゲース (東洋紡社製)にて連結させた。エレクトロポレーション法により、大腸菌XL1-Blue株 (Stratagene社製)に形質転換した。得られた形質転換体を常法に従い大量培養した。これから常法に従いプラスミドを調製し、MPL-IgG Fc

(B)/pCR3と命名した。

【0029】試験例2

ヒトIgG Fc領域融合ヒトMPL タンパク質 (MPL-IgG)を安定に発現するヒト胎児 293細胞の作製とMPL-IgG の精製
MPL-IgG Fc(B)/pCR3で、エレクトロポレーション法 (渡辺良成:組織培養の技術 第三版〔応用編〕(日本組織培養学会編), 501 頁, 1996年)によりヒト胎児 293細胞を形質転換した。形質転換されたヒト胎児 293細胞を、10%牛胎児血清含有DMEM培地で2日間培養した後、0.4 mg/ml ジェネティシン (LIFE TECHNOLOGIES社製)を含む10%牛胎児血清含有DMEMにて約2週間培養して、形質転換体を得た。この形質転換体を、約50%コンフルエントになるまで培養し、1%ニュートリドーマ(Boehringer Mannheim社製)を含むDMEM培地と交換し、培養を継続した。約1週間ごとに培地を交換しながら、3週間から4週間培養を続けた。この培地を遠心し、培養上清を回収した後、VacuCap (Gelman Sciences社製)を用いて濾過した。約7 Lの培養上清から、HiTrap Protein G (Pharmacia-Biotech社製)を用いて、添付のプロトコールに従って、カラムクロマトグラフィーを行い、MPL-IgG を精製した。

【0030】試験例3

ELISA法を用いたトロンボポエチンと被験化合物との競合実験

マイクロタイター平板ウェルに、100μl のPBS(-)で希釈した10 ng のMPL-IgG を4℃で終夜被覆した。被験体は被験化合物をDMSOに溶解後、PBS(-)/1%BSA/0.05% Tween20を用いて、最終DMSO含有率が5%となるようにトロンボポエチン (R&D 社製) 溶液 (最終濃度0.1 nM) と混ぜ合わせて作製した。ウェルよりMPL-IgG 溶液を取り除き、被験体を添加し、室温で1時間以上被覆した。この溶液を取り除き、200μl の PBS(-)/0.05% Tween 20でウェル底面を洗った後、ヤギAnti-Human TPO Neutralizing Antibody (R&D 社製)で、室温にて1時間以上インキュベートした。200 μl の PBS(-)/0.05% Tween 20でウェルを洗った後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヤギ IgG抗体 (Chemicon International社製)で、室温にて1時間以上インキュベートした。200μl の0.05% Tween20を含むPBS(-)でウェルを洗った後、100μl の TMB溶液 (DAKO社製)を加え室温で5分間インキュベートした。100μl の1M H₂SO₄ (和光純薬社製)を加え反応を停止した。光学密度を450 nmにて測定し、被験化合物を加えていない時のトロンボポエチンの結合を100%として、被験化合物によるトロンボポエチンの結合抑制作用を調べ、トロンボポエチンレセプターへの親和性を評価した。結果を図1に示す。この結果から明らかなように、本発明化合物はトロンボポエチンレセプターへの優れた親和性を示した。

【0031】試験例4

ヒトMPL を安定に発現する BaF/mp1細胞の作製

(1) 試験例1で得られたファージDNAを鋳型、プライマーとしてはMPLの開始コドンの28塩基上流から19塩基分の配列に基づいたセンスプライマー5'-CTAAGCCAGGCACACAGTG-3'と188塩基目から1907塩基目の配列に基づいたアンチセンスプライマー5'-TCAAGGCTGCTGCCAATAGC-3'を用いた。このようにして得られたPCR産物を以下に述べる工程に従ってpCR3 (Invitrogen社製)に導入して、MPL発現用の組換えプラスミドを構築した。

(2) EUKARYOTIC TA CLONING KIT (Invitrogen社製)を用い、添付のプロトコールに従って上記のPCR産物MPL cDNAをpCR3哺乳細胞発現ベクターに挿入した後、該組換えベクターを大腸菌TOP10に導入した。得られた形質転換体を常法に従って大量培養した。これから常法に従ってプラスミドを調製した。上記で得たプラスミドを用いて、エレクトロポレーション法によりマウスインターロイキン3依存性マウスプロB細胞由来Ba/F3細胞を形質転換した。形質転換されたBa/F3細胞を5 units/mlマウスインターロイキン3 (IL-3, Genzyme社製)と50 μ Mの β -mercaptoethanolを含む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地で1日間培養した後、0.8mg/ml ジェネティシン(LIFE TECHNOLOGIES社製)を含む選択培地で約2週間培養して形質転換体を得た。この形質転換体がトロンボポエチン依存性になっていることを市販のヒトトロンボポエチン(R&D社製)により確認し、BaF/mp1細胞と命名した。

【0032】試験例5

被験化合物で刺激した細胞の核抽出液の調製

BaF/mp1細胞またはBa/F3細胞を増殖因子非存在下に50 μ M β -mercaptoethanolと0.4 mg/ml ジェネティシンを含む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地で約16時間培養した後、細胞を遠心により沈澱させ、 1×10^7 細胞/mlになるように50 μ M β -mercaptoethanolを含む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地に細胞を懸濁した。この懸濁液の0.99 mlを3~4時間さらに培養した。被験体は被験化合物をDMSOに溶解後、細胞懸濁液に10 μ l 加え15分間培養した。細胞からの核抽出液は実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ サイトカイン実験法(羊土社, p115, 1997年)に準じて行った。即ち、この細胞培養液を8mlの氷冷した0.4 mM EDTAと0.4 mM Na_3VO_4 を含むPBS(-)に加え、4℃で遠心により細胞を沈澱させた。更に、氷冷した0.4 mlのバッファーH [20 mM Hepes-NaOH (pH7.9), 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 1 mM Na_3VO_4 , 20 mM NaF, 1 mM DTT(dithiothreitol), 1 mg/ml Leupeptin]で細胞を懸濁し、4℃で遠心により細胞を沈澱させた。更に細胞を氷冷した0.4 mlのバッファーI (0.2%NP-40 含有バッファーH)で懸濁し、4℃で遠心し沈澱を得た。沈澱を20 μ lのバッファーK (420 mM NaClと20%グリセロール含有バッファーH)を加えて攪拌し、4℃で20分間遠心した。この上清を核抽出液とした。

【0033】試験例6

STAT5 プロローブの調整

5 μ lのSTAT5 Gel Shift Oligonucleotides (Santa Cruz Biotechnology社製)、1 μ lのポリヌクレオチドキナーゼバッファー(東洋紡社製)、1 μ lのポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡社製、10 units/ μ l)と3 μ lの[γ - ^{32}P] ATP (Amersham社製)を混合し、37℃で1時間反応した。65℃で約15分間加熱後、エタノール沈澱を行った。沈澱を乾燥後、100 μ lのSTE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA)で溶解した。この溶液をSTEで懸濁したSephadex G50 (Pharmacia社製)を充填したセパコールミニカラム(生化学工業社製)にアブライし、数mlのSTEを界面に加え、約0.5 mlずつ分取した。放射活性の高いフラクションをQM管サーベイメーターで確認し、活性の高い溶液6本を混合した。この溶液をエタノール沈澱後、100 μ lの水に溶解し、これをSTAT5プロローブとして用いた。

【0034】試験例7

ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ サイトカイン実験法(羊土社, p115, 1997年)に準じて行った。試験例5で調整したBaF/mp1細胞及びBa/F3細胞の核抽出液それぞれ1 μ l、1 μ lのSTAT5プロローブ、1 μ lの1 μ g/ μ l poly(dI)·poly(dC) (Pharmacia-Biotech社製)、10 μ lのバインディングバッファー(20 mM Hepes-NaOH (pH7.9), 2 mM EDTA, 0.2% NP-40, 60 mM NaCl, 10%グリセロール)及び7 μ lの水を加え、室温で30分以上放置した。反応液の6.7 μ lを5%ポリアクリルアミドゲルにアブライし、0.25×TBE (22.5 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA (pH8.0))で、10 mAで約1時間電気泳動を行った。ゲルを10%酢酸-10%メタノール溶液に浸した後乾燥した。ゲルをイメージングプレート(タイプIII、富士フイルム社製)と約1時間接触させBAS2000イメージアナライザー(富士フイルム社製)で画像として取込み、ピクトログラフィー(富士フイルム社製)で印刷した。結果を図2に示す。この結果から明らかなように、本発明化合物はSTAT5を活性化することにより、トロンボポエチンレセプターに対するアゴニスト活性を示すことが分かった。

【0035】

【発明の効果】本発明の前記一般式(I)で示されるベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩は、トロンボポエチンレセプターへの優れた親和性と該レセプターに対するアゴニスト活性を有しており、血小板産生調節作用を持つ治療薬として極めて有用である。

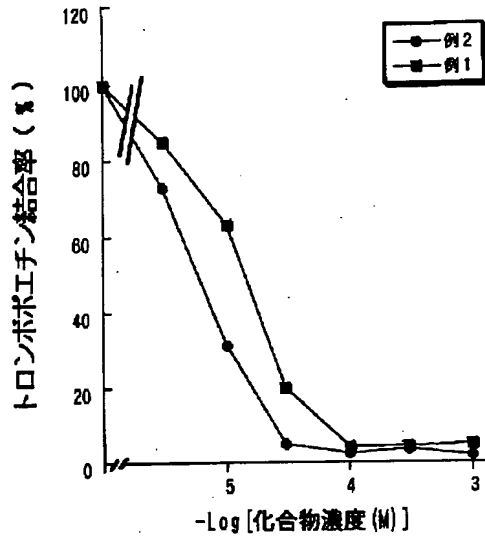
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明化合物のトロンボポエチンの結合抑制作用を測定し、本発明化合物のトロンボポエチンレセプターに対する親和性を評価した図である。

【図2】本発明化合物が STAT5を活性化することにより、トロンボポエチンレセプターに対するアゴニスト活

*性を示すことを、ゲルシフトアッセイ法を用いて評価した図である。

【図1】



【図2】

レーン1: 100 μ M の例2刺激 BaF/mpl 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン2: 100 μ M の例1刺激 BaF/mpl 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン3: 20 ng のヒトトロンボエチン刺激 BaF/mpl 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン4: 100 units のマウス IL-3 刺激 BaF/mpl 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン5: 無刺激 BaF/mpl 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン6: 100 μ M の例2刺激 Ba/F3 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン7: 100 μ M の例1刺激 Ba/F3 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン8: 20 ng のヒトトロンボエチン刺激 Ba/F3 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン9: 100 units のマウス IL-3 刺激 Ba/F3 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ
 レーン10: 無刺激 Ba/F3 細胞の核抽出液+STAT5 プローブ

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

STAT5とそのプローブ
の複合体

フリーのプローブ

フロントページの続き

(72)発明者 岩崎 信彦
福井県勝山市猪野口 37 号 1 番地 1 北陸製
薬株式会社内

(72)発明者 池田 佳隆
福井県勝山市猪野口 37 号 1 番地 1 北陸製
薬株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.